

α -甲基多巴对脑干和外周神经组织中酪氨酸羟化酶、多巴胺- β -羟化酶和苯乙醇胺-N-甲基转移酶活力的影响

明 亮*, B Renaud

(Laboratoire de Neuropharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard, 8 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France)

提要 自发性高血压大鼠(SHR) 口服 α -甲基多巴 50 mg/kg bid \times 5 d, 出现明显的降压作用。d 6 处死, 测定延脑 A_1C_1 , A_2C_2 , 蓝斑核和脊髓侧柱的酪氨酸羟化酶 (TH) 活力, 出现反馈性增强。提示它的降压作用可能与中枢伪递质的排空作用或与其阻滞 α_2 受体有关。 α -甲基多巴抑制肾上腺髓质多巴胺- β -羟化酶 (DBH)

活力, 提示抑制 NA 和 Adr 的生物合成, 从而降低外周血管紧张性。

关键词 自发性高血压大鼠; α -甲基多巴; 酪氨酸羟化酶; 多巴胺- β -羟化酶; 苯乙醇胺-N-甲基转移酶; 血管舒缩系统; 蓝斑; 肾上腺髓质

1984年4月12日收稿 1985年1月9日修回

* 现在安徽医学院药理教研室

1983年10月在第二届全国心血管药理学术会议(武汉)宣读

α -甲基多巴(methyldopa, MD)的中枢降压机制有很多学说⁽¹⁻³⁾, 当前引人重视的观点是 MD 转成 CA 的伪递质, 并反馈调控中枢 α_2

肾上腺素受体⁽⁴⁻⁵⁾。然而,此反馈调控与CA生物合成的关系未见报道。新近证实脑内肾上腺素(Adr)和去甲肾上腺素(NA)两种神经系统参与血压的调控^(4,6,7),它们的中枢部位在延脑A₁C₁和A₂C₂,通过脊髓侧柱(SLC)和交感神经系统,改变外周血管张力。本文选用中枢和外周有关组织,研究MD对CA生动物合成酶系活力的反馈影响。

材 料

MD系乙酯盐酸盐的针剂(Merck Sharp & Dohme, USA),树脂Dowex(50 W×4, 200-400目),L-酪氨酸(0.4 mM),DMPH₄(12 mM),NADPH₄(120 mM),优降宁(pargyline, 2.5 mg/ml),酪胺(30 mM),苯乙醇胺(PEA, 4 mM),延胡索酸钠(0.5 M, pH 5.5)以及牛血清蛋白(1 mg/ml)均系Sigma出品。L-[3, 5-³H]酪氨酸(50 Ci/mmol)和S-[methyl-³H]腺苷甲硫氨酸([methyl-³H]SAM, 15 Ci/mmol)均系Amersham出品。过氧化氢酶(catalase, 2600 IU/10 μl)Boehringer出品。PNMT溶液根据Saalen法制备,临用时用Tris-HCl缓冲液(0.2 M, pH 8.6)稀释为1:20。Folin试剂由Merck出品,临用前用蒸馏水稀释为1:1。脑组织粘合剂(Tissue Tek II)系Lab-Tek, USA出品。

方法与结果

MD的降压作用 SHR(Okamoto strain), ♂, 175±SD 14 g。给药前,置大鼠于实验室观察7 d。5鼠同笼,自由取食,隔天称体重一次。

给药组11鼠, d 1的5 pm, sc MD 50 mg/kg; d 2-5, 每天给药2次(9 am和5 pm); d 6的9 am给药。另有9鼠, sc生理盐水作对照。

给药前和给药d 3的am注射MD, 3 h后测量动脉血压。测量前让大鼠在38℃箱中受热10 min, 再在尾部套上压脉带, 经压力换能器, 把血压描记在电血压计(Narco Biosystem,

Electro-Sphygmomanometer PE 300 Model et Physiograph DMP 4 B)上。给药组SHR的动脉收缩压(mm Hg)从174±10下降至142±10(p<0.01), 而对照组给药前后的血压分别为173±13和179±10, 无明显差异。4只♀正常大鼠, 体重194±6 g, sc MD 60 mg/kg, 给药前和给药后2和4 h分别测量血压, 未见有明显变化。

MD对儿茶酚胺生物合成酶活力的影响

1. 组织取样^(6,7) 给药组和对照组的SHR在d 6的am给药后4 h断头, 取脑干, 冻凝后用粘合剂固定在冷冻切片机上(Leitz, Model 1310), 从第IV脑室菱形窝下2 mm开始, 切成一系列脑片(0.5 mm), 在制冷台上, 用空心针(内径0.9 mm)打孔取样。

A₆(蓝斑)位于第IV脑室上缘背部与桥脑交界处, 向上连续取3片脑片, 左右两侧打孔取样, 共6个。

A₂C₂位于延脑下缘背部, 从菱形窝下2 mm开始向上的5片脑片上, 左右两侧打孔取样, 共10个。A₂C₂的第5片脑片与A₆第1片脑片仅相隔1 mm。

A₁C₁在延脑下缘的腹部, 取样的脑片与A₂C₂相同, 共取10个。

SLC取样⁽⁸⁾, 先取胸脊(T₅-T₁₂), 在制冷台上冻凝, 用3-4张平列的刀片将脊髓切成薄片(1 mm), 然后打孔取样(内径0.5 mm, 共40个样本, 约重15 mg)。

取大鼠颈上交感神经节(SCG)和肾上腺髓质在干冰上冻凝, 然后转到制冷台上。

上述样本放在塑料管(1.5 ml)中, 贮于-80℃。测定酶活力前, 加入不同容量的磷酸钾缓冲液(2 mM, pH 6.0, 内含0.2% w/v Triton X-100), 用超声波制成匀浆。上述匀浆进行低温离心, 取上清液测定酶活力。A₁C₁, A₂C₂, A₆各取磷酸钾缓冲液300 μl, SLC取200 μl, SCG和肾上腺髓质为1 mg/200 μl时, 用于测定酪氨酸羟化酶(TH); 或1 mg/500 μl用于测定多巴胺-β-羟化酶(DβH)和苯乙醇胺

-N-甲基转移酶(PNMT)。

2. TH 活力测定 基本上按文献⁽⁵⁾方法测定。

利用 l -[3,5-³H] tyrosine 为底物, 为 TH 所羟基化时, 形成 1:1 M 的 [³H]H₂O 和 [³H]dopa, 而 [³H]dopa 被 Dowex 层析柱吸附后, 所流出的 [³H]H₂O 供定量测定。

在 SHR 中, 给药组脑内的 TH 活性明显增强, A₁C₁ 增加 32% (p<0.01); A₂C₂ 增加 25% (p<0.01); A₆ 增加 34% (p>0.05); SLC 增加 45% (p<0.01), 而给药组外周组织中 TH 活力没有明显变化。

正常大鼠(20 只, ♂, 189±14 g), sc MD 后, 在脑片和外周组织 TH 活力均未见明显变化。

此外, 当体外加入 MD (最终浓度 10⁻⁸-10⁻⁶M) 于脑片试验, TH 活力 (93-98%) 与不给药组 (100%) 无明显差异。这表明 MD 对中枢 TH 活力的增强是由于在脑内转化并作用于神经元的结果。

Tab 1. Effect of α -methyl-dopa (MD) on the activity of tyrosine hydroxylase (l -dopa pmol/mg/protein/h) of SHR. ($\bar{x}\pm SD$). *p>0.05; ***p<0.01

	Control	After MD
A ₁ C ₁	267±42	352±38***
A ₂ C ₂	202±22	254±37***
A ₆	957±393	1286±400*
SLC	57±16	82±13***

3. D β H 和 PNMT 活力测定 基本上按文献⁽⁷⁾方法测定。

D β H 活力测定: 酪胺 (tyramine) 在 D β H 催化下, 羟化为罾胺 (octopamine), 并为优降宁所保护, 随之, 罾胺被 PNMT 转化为脱氧肾上腺素 (synephrine)。此时按 [methyl-³H]SAM 的放射酶学方法作定量测定, 敏感度增加 10²-10³ 倍。

PNMT 活力测定: 以 PEA 为底物, 加入 [methyl-³H]SAM, 由 PNMT 催化放射性甲基转移到 PEA。N-[methyl-³H]PEA 加入闪烁液进行放射性测定。

实验结果表明, MD 对 SHR 和正常大鼠中枢的 A₆, A₁C₁, A₂C₂ 和 SLC 的 D β H 和 PNMT 活力与对照组相比, 无明显变化; 除了肾上腺髓质的 D β H 活力有明显减弱外 (表 2, p<0.01), MD 对 SCG 和肾上腺髓质也无明显的影响。

Tab 2. Effects of α -methyl-dopa (MD) on the activities of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine- β -hydroxylase (D β H) and phenethanolamine-N-methyltransferase (PNMT) in adrenal medulla and sympathetic cervical ganglion (SCG) of spontaneously hypertensive rats (SHR). The concentrations (nmol/h) of dopa, octopamine and N-[methyl-³H]PEA formed indicated the activities of TH, D β H and PNMT, respectively. $\bar{x}\pm SD$. *p>0.05, ***p<0.01

	Rats	TH	D β H	PNMT
Adrenal medulla:				
Control	9	18.8±3.6	27.4±2.8	4.0±0.5
MD	11	20.5±2.4	22.5±3.3***	4.4±0.5*
SCG:				
Control	4	2.1±0.5	12.0±3.5	
MD	8	2.3±0.4	10.7±1.4	

讨 论

本文实验证明, MD 能普遍地增强 A₁C₁, A₂C₂, A₆ 和 SLC 的 TH 酶活力, 这是很有价值的结果。因为 A₁C₁ 和 A₂C₂ 是血管运动中枢的重要组成部分, A₆ 能调控 A₁C₁ 和 A₂C₂ 的作用⁽⁴⁾, 从而提示 MD 的降压作用与延脑血管运动中枢有联系。这种作用是通过突触前 CA 受体的反馈调控的作用原理来实现的。不论 NA 或 Adr 两种神经元的反馈调控作用, 均从 TH 酶活力反映出来。由于 MD 不影响 PNMT 酶活力, 所以它对 Adr 神经元的单独影响难以确切说明。MD 增强 TH 酶活力的解释有 3 种可能性: 1) MD 直接增强 TH 酶活力, 本文的体外实验已否定这个可能性, 换言之, MD 必须在体内转化后才起作用; 2) 形成伪递质^(9,10), 排空 CA 递质, 而后反馈性增强 TH 酶活力,

本文的资料支持了伪递质学说; 3) 这些伪递质作用在延脑血管运动中中枢的突触前或突触后 NA 和 Adr 受体。MD 是中枢 NA 或 Adr 神经元上的 α_2 受体的激动剂^(3,4,11,12), 按照突触前受体的反馈作用原理⁽¹³⁾, 激动剂是抑制 TH 酶活力, 而阻滞剂增强 TH 酶活力。所以, 本文的工作不支持前人提出的 MD 属于 α_2 受体激动剂作用的观点。总之, 本文从脑干 TH 酶活力增强的结果, 对 MD 的降压机理提出两种可能性: 由 MD 的有效代谢产物起伪递质的排空作用, 或者由伪递质阻滞了突触前 NA 和 Adr 受体。

肾上腺髓质中 D β H 酶活力被抑制, 提示 MD 减少 NA 和 Adr 的生物合成, 可能减弱外周血管紧张性, 有利于降压作用的实现。

致谢 部分工作得到当时在法国里昂大学神经功能生化研究室访问学者金国章副教授的指导和帮助, 并对本文作了修审。本文还得到徐叔云教授的审阅。

参 考 文 献

- 1 Hess SM, Connamacher RH, Ozaki M, Udenfriend S. *J Pharmacol Exp Ther* 1961; 134:129
- 2 Beart PM, Prosser D, Louis WJ. *Clin Exp Phar-*

- macol Physiol* 1981; 8:25
- 3 Starke K. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; 77:1
- 4 Fuxe K, Agnati LF, Ganten D, et al. Studies on the cardiovascular function of central catecholamine pathway. In: Schott B, ed. *Les neuromédiateurs du tronc cérébral*. Lyon: Sandoz, 1980:13-35
- 5 Renaud B, Fourniere S, Denoroy L, et al. *Brain Res* 1978; 159:149
- 6 Renaud B, Joh TH, Reis DJ. *Ibid* 1979; 173:164
- 7 Denoroy L, Heimburger M, Renaud B, et al. *Biochem Pharmacol* 1981; 30:2673
- 8 Fety R. Effects d'une microinjection intraventriculaire de 6-hydroxydopamine sur les neurones catécholaminergiques du tronc cérébral inférieur de rat. *Thèse de docteur in pharmacie*, Université Claude Bernard, Lyon, France, 1981
- 9 Cohen Y, Wepierre J, Jacquot C, Rapin J. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1974; 207:348
- 10 Goldberg MR, Tung CS, Ring M, et al. *Clin Exp Hypertens* 1982; 4:595
- 11 Goldberg MR, Gerkens JF, Oates JA, Robertson D. *Eur J Pharmacol* 1981; 69:95
- 12 Langer SZ. *Hypertension* 1980; 2:372
- 13 金国章. 脑内单胺和 M-胆碱能神经系统药理学的一些进展. 见: 药理学进展, 北京: 人民卫生出版社, 1985: 付印中

Acta Pharmacologica Sinica 1985 Dec; 6(4):244-248

EFFECTS OF α -METHYLDOPA ON SYSTOLIC PRESSURE AND ACTIVITIES OF TYROSINE HYDROXYLASE, DOPAMINE- β -HYDROXYLASE AND PHENETHANOLAMINE-N-METHYL-TRANSFERASE IN NERVOUS SYSTEM OF SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

明 亮, B Renaud

(Lab Neuropharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université Claude Bernard, 8 Avenue Rockefeller, 69008 Lyon, France)

ABSTRACT After α -methyldopa (MD) sc 50 mg/kg bid x 5 d, the systolic pressure of spontaneously hypertensive rats (SHR) was decreased, while no effect on blood pressure of normotensive rats was seen.

Treated with MD, SHR were killed on d 6. The brains, superior cervical ganglions (SCG),

and adrenal medulla were excised. The brain slices were punched from locus coeruleus (A_8), vasomotor center of medulla oblongata (A_1C_1 , A_2C_2) and spinal sympathetic lateral column (SLC). The activities of tyrosine hydroxylase (TH), dopamine- β -hydroxylase (D β H) and phenethanolamine-N-methyltransferase

(PNMT) were determined by radio-enzymatic methods. The TH activities in A_1C_1 , A_2C_2 , SLC and A_8 were increased, whereas no marked effects on the activities of D β H and PNMT in them were found. Thus, it indicated that MD &/or its metabolites had a positive feed-back regulation on the TH activity from presynaptic receptor of NA- &/or Adrenaline neurons in vasomotor center, SLC and A_8 . It is surmised that MD &/or its metabolites are antagonists of α_2 -receptors (not agonists) to explain the central hypotensive effect of MD.

The D β H activity only in adrenal medulla was inhibited by MD. It is suggested that the reduction of peripheral vasotension was in consequence of the lowering contents of NA and Adr in peripheral tissues.

KEY WORDS spontaneously hypertensive rats; α -methyldopa; tyrosine hydroxylase; dopamine beta-hydroxylase; phenethanolamine N-methyltransferase; vasomotor system; locus coeruleus; adrenal medulla